

## • 基础实验研究论著 •

# 新西兰乳兔成骨细胞分离、培养与鉴定的实验研究\*

刘小荣<sup>1</sup>, 张 篓<sup>1</sup>, 王勇平<sup>2△</sup>, 张玉娟<sup>1</sup>, 邹传瑛<sup>1</sup>

(1. 甘肃省第二人民医院检验科, 甘肃兰州 730020; 2. 兰州大学第一医院骨科, 甘肃兰州 730000)

**摘要:** 目的 探讨新西兰乳兔成骨细胞体外分离、培养及鉴定的实验方法。方法 采用二次酶消化法从新西兰乳兔颅骨组织块分离成骨细胞并进行原代培养, 采用倒置相差显微镜进行形态学观察, 吖啶橙荧光染色检测其黏附功能, 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测其增殖情况, 采用茜素红及四环素染色检测其矿化功能。结果 成功获得原代成骨细胞; 倒置相差显微镜显示未贴壁的细胞呈圆形, 贴壁生长的细胞呈不规则梭形、三角形或多角形; 吖啶橙染色可见成骨细胞的细胞核呈绿色荧光, 具有良好的黏附能力; 茜素红染色及四环素染色均显示其有良好的钙化能力; 成骨细胞具有良好的增殖能力。结论 采用二次酶消化法能在短时间内获得大量具有典型形态特征和生物学活性的成骨细胞。

**关键词:** 成骨细胞; 细胞分离; 细胞培养技术; 鉴定; 兔

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.003

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)09-1095-03

## A experimental study on isolation, culture and identification of osteoblasts from neonatal New Zealand rabbit\*

Liu Xiaorong<sup>1</sup>, Zhang Li<sup>1</sup>, Wang Yongping<sup>2△</sup>, Zhang Yujuan<sup>1</sup>, Zou Chuanying<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Provincial People's Hospital of Gansu, Lanzhou, Gansu 730020, China; 2. Department of Orthopedics, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

**Abstract:** Objective To investigate the experimental methods of isolation, culture and identification of osteoblasts from neonatal New Zealand rabbits *in vitro*. Methods Two-step enzymatic digestion was adopted to isolate osteoblasts from skull tissue of neonatal New Zealand rabbits to conduct primary cultured. Inverted phase contrast microscope was employed to study the cellular morphology, acridine orange fluorescent staining was used to detect the cell adhesion function, methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay was employed to measure their proliferation, and Alizarin red and tetracycline staining were used to test their mineralization. Results Primary osteoblasts were successfully obtained. Inverted phase contrast microscopy showed non-adherent cells were round, while adherent cells were irregular fusiform, triangular or polygonal. Acridine orange staining showed the nuclei of osteoblasts green fluorescence, with good adhesion ability. Good mineralization ability was also demonstrated by tetracycline and alizarin red staining. Osteoblasts possessed good proliferation activity. Conclusion Utilization of two-step enzymatic digestion contributes to getting a lot of osteoblasts with typical morphological features and biological activity in a short time.

**Key words:** osteoblasts; cell separation; cell culture techniques; identification; rabbits

成骨细胞是骨形成细胞, 对骨组织的生长发育、骨代谢平衡、骨量平衡和骨损伤修复具有重要作用。体外培养成骨细胞是研究其生长、代谢的基础<sup>[1]</sup>。由于成骨细胞位于致密的骨组织中, 取材困难。采用组织块法、酶消化法、骨膜组织块法、骨髓组织块法及薄层骨片法, 经乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)及胶原酶处理, 均可分离、培养成骨细胞, 但其纯度不一<sup>[2-8]</sup>。本课题组对新西兰乳兔颅骨采用二次酶消化法分离、培养成骨细胞, 进行体外培养, 采用形态学观察、吖啶橙荧光染色、矿化结节染色及四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测对成骨细胞进行鉴定, 以建立一种简单、快速, 成活率和纯度高的原代培养方法, 以获得大量成骨细胞, 探讨其生物学特性, 为骨组织工程提供足够的种子细胞、理论依据和实践经验。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

主要试剂: $\alpha$ -MEM 培养基、10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及 0.25% 胰蛋白酶购自美国

Gibco 公司, MTT、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)及吖啶橙为美国 Sigma 公司产品; 主要仪器包括荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo 公司)、Wellscan MK-3 全自动多功能酶标仪(芬兰 Labsystems Dragon 公司)及超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

**1.2 实验动物** 健康新西兰乳兔 4 只, 体质量 2.5~3.0 kg, 清洁级, 由甘肃中医药大学动物实验中心提供[许可证: SCXK(甘)2011-0001], 实验过程符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

**1.3 成骨细胞的分离与培养** 将新生新西兰兔的颅骨组织在无菌条件下迅速转移至超净工作台, 用含 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗 3 次; 然后在  $\alpha$ -MEM 培养基中将其切成大小约 0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm 的碎块, 置于 20 mL 无菌离心管中, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶预消化 20 min 后, 加入 3~

\* 基金项目: 兰州大学第一医院院内基金资助项目(lyyy2013-01)。 作者简介: 刘小荣, 女, 硕士, 主要从事检验医学及病原生物学检测的研究。 △ 通讯作者, E-mail: wangyp312@163.com。

5 mL 含 10% FBS 的 α-MEM 培养基终止消化, 弃上清液, 加入 I 型胶原酶 10 mL(1.0 g/L), 置于 37 ℃ 孵箱中 90 min, 终止消化, 200 目滤网过滤去除骨碎片, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀即为成骨细胞, 沉淀物以 10% FBS、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素的 α-MEM 培养基重悬细胞。将收集的细胞接种于 25 mL 培养瓶中, 用 α-MEM 培养基(含 10% FBS)培养, 每 3 d 换液 1 次, 细胞生长覆盖瓶底面积 80% 以上时, 用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA) 消化, 进行传代培养。

#### 1.4 成骨细胞的鉴定

**1.4.1 成骨细胞形态学观察** 用倒置相差显微镜观察培养成骨细胞的形态, 以了解其生长状况及生命活动规律。

**1.4.2 成骨细胞黏附功能的测定(吖啶橙荧光染色)** 取生长状态良好的原代成骨细胞, 95% 乙醇固定 10 min, 干燥后加入足量 0.01% 叩啶橙染液, 染色 5 min, PBS 漂洗 1 min, 0.1 mol/L 氯化钙分色 1 min; 最后, PBS 漂洗 3 次, 每次数秒。在荧光显微镜下用蓝紫光激发滤片进行观察。

**1.4.3 成骨细胞增殖功能的测定** 将生长状态良好的原代成骨细胞接种于 5 块 96 孔培养板中(细胞密度为  $2 \times 10^4$  个/L), 在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 及 95% 湿度条件下培养, 每 3 d 换液 1 次。将细胞分别培养 1、4、7、10 和 14 d 后(每组设 6 个复孔), 加入 5 g/L MTT(20 μL/孔), 37 ℃ 孵育 4 h, 弃上清液, 加 DMSO(200 μL/孔), 振荡 15 min 使结晶物充分溶解。在酶标仪上检测 490 nm 波长处的光密度(optical density, OD)值, 取平均值, 以时间为横轴, OD 值为纵轴, 绘制细胞生长曲线。

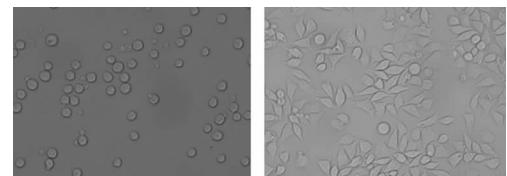
**1.4.4 成骨细胞矿化功能的测定** (1)茜素红矿化结节染色: 细胞接种方法同上, 培养至第 21 天时吸弃培养基, PBS 漂洗 2 次; 95% 乙醇固定 30 min, PBS 漂洗 3 次; 0.1% 茜素红 37 ℃ 染色 30 min, PBS 漂洗, 晾干; 低倍显微镜视野下进行矿化结节观察。(2)四环素矿化结节染色: 培养至第 21 天时吸弃培养基, 用四环素(50 μg/mL)标记 30 min, 更换新鲜培养基继续培养 30 min, PBS 漂洗, 95% 乙醇固定 10 min, 晾干, 荧光显微镜观察矿化结节。

### 2 结 果

#### 2.1 成骨细胞形态学特征

**2.1.1 倒置相差显微镜观察** 刚接种的成骨细胞呈球形, 细胞悬于培养基中并逐渐沉降贴壁。24 h 后, 存活细胞完全贴壁展开, 此时细胞形态不规则, 多呈三角形、多角形; 有较多突

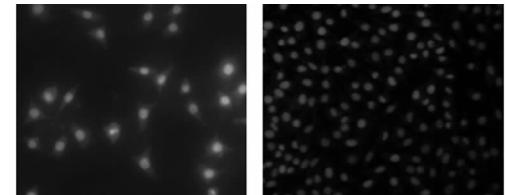
起; 单核呈卵圆形, 1~3 个核仁; 细胞质丰富, 清晰。细胞长满瓶壁时, 细胞多呈梭形或立方形, 排列紧密, 见图 1。如不及时传代, 继续生长, 细胞密度增大, 可逐渐失去极性, 细胞形态不易辨认。生长期细胞分离相多见, 细胞突起互相连接; 汇合时, 细胞呈铺路石状, 并可重叠生长, 重叠生长的细胞逐渐形成细胞小结, 随后胶原堆积、钙盐沉积, 形成不透光矿化结节。连续培养十几代后, 可见细胞体积增大, 细胞质稀薄, 细胞核缩小, 分裂相少见等退行性改变。



左:接种时;右:接种 24 h 后。

图 1 新西兰兔成骨细胞的倒置相差显微镜观察(×200)

**2.1.2 荧光显微镜观察** 成骨细胞的细胞核呈清晰绿色荧光, 且第 1 代细胞贴壁时间较原代成骨细胞短, 其增殖速度加快, 见图 2。

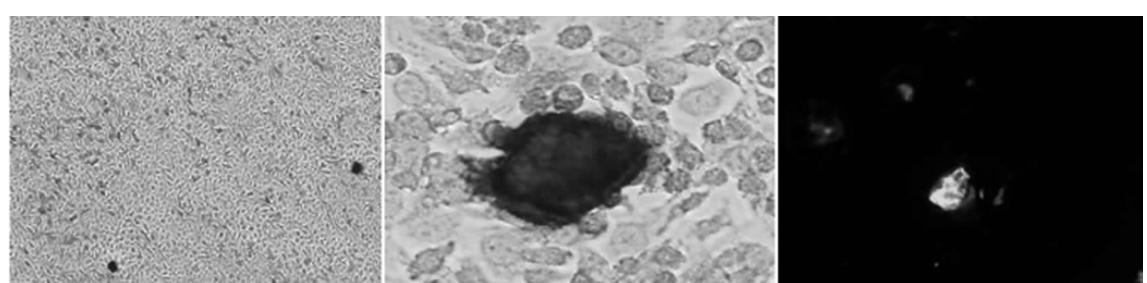


左:接种第 1 天;右:接种第 3 天。

图 2 新西兰兔成骨细胞的荧光显微镜观察(吖啶橙荧光染色 ×200)

**2.2 成骨细胞的增殖能力** 接种第 1、2 天为细胞潜伏适应期, 增殖缓慢; 第 3~7 天的细胞生长曲线基本为线性, 为细胞的对数生长期, 细胞快速增殖; 7 天后, 细胞生长曲线变得平缓, 细胞增殖明显减慢, 进入平台期, 并于第 10 天达到高峰; 此后进入生长衰减期, 呈下降趋势。

**2.3 矿化结节染色法** 成骨细胞进行茜素红矿化结节染色, 可见多个大小不等的矿化结节, 见图 3 左; 也可见多个矿化结节融合而成的较大矿化结节, 见图 3 中。四环素标记后用荧光显微镜观察, 矿化结节呈绿色, 将图 3 右。



左:大小不等的矿化结节(茜素红染色 ×100);中:融合的矿化结节(茜素红染色 ×200);右:矿化结节(四环素染色 ×200)

图 3 新西兰兔成骨细胞的矿化结节

### 3 讨 论

骨是由矿化有机基质和骨细胞组成的, 骨发生开始于成骨细胞生成和 I 型胶原分泌。成骨细胞在骨形成过程中要经历

细胞增殖、细胞外基质成熟、矿化和细胞凋亡 4 个阶段, 这 4 个阶段之间没有明确界限, 细胞分化和增殖是细胞生命进化过程中所获得的基本属性, 存在 2 种状态, 即功能态和增殖态。功

能态是指细胞在分化的基础上完成特定功能活动,如分泌、传导、吞噬等,成骨细胞主要完成成骨活动;增殖态是指细胞进行细胞质和细胞核的复制,继而发生有丝分裂,将细胞质和细胞核进行平均分配,细胞数量增加<sup>[1]</sup>。成骨细胞演化的不同阶段,均需借助精细调控,以最终完成正常的骨形成<sup>[2]</sup>。

由于很难直接在人类活组织上对骨的结构、功能及代谢进行研究,因此,体外培养成骨细胞是研究成骨细胞生长、代谢的基础。但成骨细胞来源有限,如何获得高纯度及高活性的成骨细胞,研究者一直进行着不懈的努力。1969 年,Peck 等<sup>[3]</sup>开始从事动物胚胎骨成骨细胞培养的研究工作,1979 年 Mills 等<sup>[4]</sup>首先报道用组织块培养法在体外成功培养了人成骨细胞,此后陆续有成功培养成骨细胞的报道。随着细胞培养技术的发展,现在可从许多动物的骨、骨膜、骨髓基质及骨外组织中成功培养出成骨细胞。目前,成骨细胞的培养方法主要分为酶消化法和组织块法,这 2 种方法均存在一定的局限性,于是人们采用改良酶消化法以及将 2 种方法结合的联合培养法<sup>[5]</sup>。本课题组采用二次酶消化法从新西兰乳兔颅骨分离成骨细胞,进行体外培养,以建立成骨细胞体外分离及培养体系。新西兰乳兔颅骨来源广泛、经济,取材方便。采用二次酶消化法,首先用胰酶对整块颅骨预消化,一方面可以减少胰酶对成骨细胞的损伤;另一方面能使成纤维细胞、破骨细胞、骨生成细胞首先脱落。剪碎后再用胶原酶消化,这样使更多的成骨细胞游离出来。传代时,采用差速贴壁法进一步纯化成骨细胞,使最终获得的成骨细胞纯度高、活性好。此法不仅简化了成骨细胞的分离步骤,而且减少了因反复消化、洗涤、离心对成骨细胞造成的损伤,使分离出的原代成骨细胞具有良好的活性。

由于成骨细胞无特异性标记物,因此,本研究通过形态学观察、吖啶橙染色、矿化结节染色及细胞生长曲线对成骨细胞进行鉴定。结果显示,细胞形态与文献[2,13]的报道一致。吖啶橙荧光染色可见成骨细胞核呈清晰绿色荧光,且第 1 代细胞贴壁时间较原代成骨细胞短,表现出良好的黏附贴壁功能。

矿化能力是成骨细胞的一项重要生物学特征<sup>[14]</sup>,本研究显示进行成骨细胞茜素红矿化结节染色,可见多个大小不等的矿化结节及多个矿化结节融合而成的较大矿化结节;四环素标记后用荧光显微镜观察,矿化结节呈绿色,表明培养的成骨细胞具有良好的矿化功能。

成骨细胞的增殖率和生物学活性控制着骨的形成,加速成骨细胞的增长是有效骨修复的关键因素,因此,本研究对成骨细胞的增殖功能也进行了检测,细胞生长曲线显示接种第 1、2 天为细胞潜伏适应期,增殖缓慢;第 3~7 天为细胞的对数生长期,细胞快速增殖;第 7 天后细胞增殖明显减慢,进入平台期,并于第 10 天达到高峰;此后进入生长衰减期,该曲线符合成骨细胞的增殖规律,显示了良好的生物学活性和功能。

综上所述,本实验用二次酶消化法可在短时间内获得高纯

度和高存活率的成骨细胞,经形态学、钙化结节染色及细胞增殖活性检测,证实培养的细胞保留了稳定的成骨细胞表型特征,具有良好的生物学活性和功能,适用于体外实验研究的模型。

## 参考文献

- [1] 王勇平,廖燚,蒋垚.成骨细胞的体外培养与鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(33):6231-6234.
- [2] 李晓峰,赵劲民,苏伟,等.大鼠成骨细胞的原代培养和鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(6):990-994.
- [3] 徐展望,许波,李军.成骨细胞体外培养研究进展[J].山东中医药大学学报,2004,28(4):313-315.
- [4] 吴璇,刘洪臣,鄂玲玲,等.建模时间及糖浓度对糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞培养的影响[J].中华老年口腔医学杂志,2008,6(1):43-46.
- [5] Declercq H, Van den Vreken N, De Maeyer E, et al. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source[J]. Biomaterials, 2004, 25(5):757-768.
- [6] 邵敏,张百挡,梁祖建,等.骨质疏松人成骨细胞的体外分离培养与鉴定[J].中国骨质疏松杂志,2010,16(2):89-92.
- [7] Turhani D, Watzinger E, Weissenböck M, et al. Analysis of cell-seeded 3-dimensional bone constructs manufactured in vitro with hydroxyapatite granules obtained from red algae[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2005, 63(5):673-681.
- [8] Ng AM, Saim AB, Tan KK, et al. Comparison of bioengineered human bone construct from four sources of osteogenic cells[J]. J Orthop Sci, 2005, 10(2):192-199.
- [9] 王勇平,欧阳元明,蒋垚.成骨细胞分化及增殖调控的研究进展[J].上海交通大学学报:医学版,2011,31(10):1465-1469.
- [10] Peck NA, Birge SJ Jr, Fedak SA, et al. Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation[J]. Science, 1964, 146(3650):1476-1477.
- [11] Mills BC, Singer FR, Weiner LP, et al. Long-term culture of cells from bone affected by Paget's disease[J]. Calcif Tissue Int, 1979, 29(1):79-87.
- [12] 鄂玲玲,刘洪臣,吴霞,等.改良大鼠下颌骨成骨细胞原代培养与鉴定[J].中华老年口腔医学杂志,2007,5(4):226-229.
- [13] 杨玉生,孙俊英,朱伟,等.松质骨源性人成骨细胞的分离培养和细胞密度效应[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(3):431-434.
- [14] Marie PJ, Lomri A, Sabbagh A, et al. Culture and behavior of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces[J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1989, 25(4):373-380.

(收稿日期:2013-12-07)

## 误差

误差指测量值与真值之差,也指样本指标与总体指标之差。包括系统误差、随机测量误差和抽样误差。系统误差指数据收集和测量过程中由于仪器不准确、标准不规范等原因,造成观察(检测)结果呈倾向性的偏大或偏小,是可避免或可通过研究设计解决的。随机测量误差指由于一些非人为的偶然因素使观察(检测)结果或大或小,是不可避免的。抽样误差指由于抽样原因造成样本指标与总体指标的差异,是不可避免但可减少的。